

Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11) **EP 0 939 319 A2**

(12) **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(43) Veröffentlichungstag:
01.09.1999 Patentblatt 1999/35

(51) Int. Cl.⁶: **G01N 33/543**

(21) Anmeldenummer: **99103135.2**

(22) Anmeldetag: **17.02.1999**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE**
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: **19.02.1998 DE 19806989**

(71) Anmelder: **Roche Diagnostics GmbH
68305 Mannheim (DE)**

(72) Erfinder: **Hornauer, Hans Dr.
82380 Peissenberg (DE)**

(74) Vertreter:
**Weiss, Wolfgang, Dipl.-Chem. Dr. et al
Postfach 86 08 20
81635 München (DE)**

(54) **Erzeugung räumlich scharf begrenzter Festphasen für Bindungsassays**

(57) Es wird ein Verfahren zum Aufbringen einer mehrlagigen Beschichtung auf einen festen, nicht porösen Träger, ein Verfahren zur Vermeidung des Verschmierens von räumlich begrenzten Festphasen sowie ein Verfahren zur Verringerung der unspezifischen Bindung an eine beschichtete Festphase beschrieben.

EP 0 939 319 A2

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Aufbringen einer mehrlagigen Beschichtung auf einen festen, nicht porösen Träger, ein Verfahren zur Vermeidung des Verschmierens von räumlich begrenzten Festphasen, ein Verfahren zur Verringerung der unspezifischen Bindung an eine mit Streptavidin oder Avidin beschichtete Festphase sowie Festphasen, die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt werden.

[0002] Bindungsassays zur Bestimmung von Analyten, wie etwa Immunoassays, Nukleinsäurehybridisierungsassays usw. werden in großem Umfang eingesetzt. Der Nachweis eines Analyten durch Bindungsassays kann mit einer heterogenen Testführung erfolgen, wobei eine flüssige Phase mit einer Festphase in Kontakt gebracht wird. Die Festphase umfaßt Testflächen mit Rezeptormolekülen, an die der Analyt spezifisch bindefähig ist. Die Bindung des Analyten wird anschließend, z.B. mittels einer Markierung, nachgewiesen.

[0003] Für eine zuverlässige qualitative oder quantitative Bestimmung eines Analyten, ist es notwendig, die Testflächen der Bindungsassays reproduzierbar und mit genau definierten Mengen an Rezeptormolekülen herstellen zu können. Unterschiede in der Größe der Testflächen, Randunschärfe der Testflächen, Verschmieren der Rezeptormoleküle, unterschiedliche Rezeptordichte in den Testflächen und unspezifische Bindestellen führen zu Unterschieden in der detektierten Signalthöhe und somit zu Ungenauigkeiten bei der Auswertung von Testergebnissen.

[0004] Diese Probleme wirken sich zumeist umso stärker aus, je kleiner die Festphase und die darauf befindlichen Testflächen sind. Liegen einzelne Testflächen mit unterschiedlichen Rezeptormolekülen zum Nachweis verschiedener Analyten nahe beieinander, so kann es durch Randunschärfe der Testflächen oder/und Verschmieren der Rezeptormoleküle zur Kontamination spezifischer Testflächen mit gegen einen anderen Analyten gerichteten Rezeptormolekülen kommen, was zu falschen Testergebnissen führen kann. Besonders schwerwiegend ist dieses Problem bei qualitativen Tests zum Nachweis von Infektionskrankheiten. So hat z.B. eine aufgrund von Verschmieren der Rezeptormoleküle falsch positive Probe bei einem HIV-Test erhebliche Konsequenzen.

[0005] Eine Vielzahl von Testformaten beruht auf der Verwendung von porösen Trägermaterialien wie etwa Papierscheiben oder anderen porösen Materialien. Bei solchen Testformaten, wie sie beispielsweise in der EP-A-0 427 984 und der EP-A-0 063 810 beschrieben sind, wird eine Rezeptorschicht auf einem porösen Material gebildet, indem Rezeptormoleküle aus einer Lösung auf das poröse Material aufgebracht und durch das Trägermaterial aufgesaugt wurden. Das Aufsaugen der Beschichtungslösung bewirkt insbesondere eine von der lokalen Mikrostruktur des Trägermaterials abhängige Aufweitung der beschichteten Fläche. Es ist deshalb schwierig, mit dieser Methode reproduzierbare gleichmäßige Testflächen, insbesondere in miniaturisierten Testformaten bereitzustellen. Zudem ist bei solchen miniaturisierten Testformaten auf Basis von porösen Trägermaterialien die Auswertung schwierig. Durch die Unebenheit und Ungleichmäßigkeit der Oberfläche poröser Materialien kann zumeist nur eine begrenzte optische Auflösung der Testflächen erreicht werden.

[0006] Es wurde deshalb versucht, anstelle von porösem Trägermaterial ein Trägermaterial mit einer nichtporösen Oberfläche zu verwenden. US-PS-4,591,570 beschreibt eine Immunoassay-Vorrichtung zur gleichzeitigen Bestimmung mehrerer Antigene mit Hilfe eines Antikörperarrays, wobei als Träger Glas oder Kunststoff verwendet wird. Durch die Verwendung dieses Trägermaterials ist es möglich, die Gesamtgröße des Testformats und somit die benötigte Probenmenge deutlich zu verringern. Allerdings tritt auch bei nichtporöser Oberflächen, insbesondere bei miniaturisierten Testverfahren, das Problem auf, daß die Rezeptormoleküle verschmieren. Ein Verschmieren kann durch unkontrolliertes Spritzen der aufgetragenen Beschichtungslösung, d.h. eine Flächenzunahme, bei der die Kontur regelmäßig bleibt, verursacht werden. Daneben kann auch ein unkontrolliertes Zerfließen der aufgetragenen Beschichtungslösung auftreten, was zu einer unregelmäßigen Kontur führt. Schließlich kann das Verschmieren eine Verfrachtung von Rezeptormolekülen in den Bereich außerhalb der mit Beschichtungslösung benetzten Flächen bewirken.

[0007] Viele der üblicherweise verwendeten Rezeptormoleküle, wie etwa niedermolekulare Rezeptormoleküle, adsorbieren zudem nur schlecht oder schlecht reproduzierbar auf festen Trägern mit nichtporösen Oberflächen. Weiterhin enthalten viele wässrige Lösungen von Rezeptormolekülen, wie sie üblicherweise zum Aufbringen von Rezeptormolekülen auf Festphasen verwendet werden, zum Stabilisieren ein Detergens, wodurch die Adsorption der Rezeptormoleküle auf feste Träger mit nichtporösen Oberflächen zumindest zum Teil verhindert wird.

[0008] Um die Bindefähigkeit von Rezeptormolekülen an nichtporöse Oberflächen zu verbessern, können mehrlagige Beschichtungen aufgebracht werden. Aber auch bei solchen Beschichtungen treten innerhalb einzelner Testflächen Unterschiede in der Größe und Randunschärfen auf, was bei der Auswertung, insbesondere von miniaturisierten Testformaten, erhebliche Probleme ergibt.

[0009] Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es deshalb, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem räumlich scharf begrenzte Testflächen für Bindungsassays erhalten werden können.

[0010] Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zum Aufbringen einer mehrlagigen Beschichtung auf einen festen, nichtporösen Träger, umfassend die Schritte:

- (a) Aufbringen einer Vorbeschichtung auf ein Reagenzfeld des festen Trägers,

(b) Waschen des vorbeschichteten Trägers mit einer wässrigen Flüssigkeit und

(c) Aufbringen einer zweiten Beschichtung, umfassend Rezeptormoleküle, die mit der Vorbeschichtung bindefähig sind, auf den vorbeschichteten Träger in Form von räumlich begrenzten Flächen auf dem Reagenzfeld.

[0011] Erfindungsgemäß wird der feste, nichtporöse Träger zunächst mit einer Vorbeschichtung versehen. Die Vorbeschichtung kann dabei vollflächig auf einen Teil oder auf die gesamte Fläche eines Reagenzfeldes des festen Trägers oder auch in Form von Spots aufgetragen werden. Bevorzugt wird die Vorbeschichtung vollflächig aufgetragen. Die Vorbeschichtung wird typischerweise aus einer wässrigen Lösung auf den Träger aufgebracht. Sie kann aus beliebigen Molekülen bestehen, welche die Bindung einer zweiten Beschichtung ermöglichen. Bevorzugt umfaßt die Vorbeschichtung einen ersten Partner eines hochaffinen Bindepaares, wie z.B. Streptavidin, Avidin oder Biotin sowie Analoga, Derivate und Konjugate der vorstehenden Substanzen, oder Antikörper wie z.B. Anti-Maus-Antikörper. Es können aber auch Moleküle als Vorbeschichtung aufgebracht werden, die für eine kovalente Bindung mit der zweiten Beschichtung vorgesehen sind, etwa Moleküle, die eine Amin-, eine Sulfid- oder eine Silylgruppe enthalten.

[0012] Wenn man auf eine solche Vorbeschichtung Rezeptormoleküle in wässriger Lösung in Form kleiner Tröpfchen aufbringt, diffundieren sie aus der Lösung an die Vorbeschichtung und binden an diese. Es wurde jedoch festgestellt, daß die aufgetragenen Flüssigkeitströpfchen verlaufen, was zu unterschiedlicher Kontur und Größe der Spotflächen führt. Daraus resultieren Unterschiede in der Rezeptordichte in den einzelnen Testflächen und somit Unterschiede in der Signalthöhe die zu falschen Resultaten führen können.

[0013] Überraschenderweise wurde nun festgestellt, daß durch Einführen des Verfahrensschrittes (b), nämlich Waschen des vorbeschichteten Trägers mit einer wässrigen Flüssigkeit, reproduzierbare, gleichförmige Testspots erhalten werden können. Das Waschen des vorbeschichteten Trägers kann mit reinem Wasser durchgeführt werden, bevorzugt wird ein Puffer mit geringer Ionenstärke verwendet. Die wässrige Flüssigkeit oder Waschlösung, die zum Waschen des vorbeschichteten Trägers verwendet wird, kann Puffersubstanzen, Detergenzien oder/und sonstige Zusätze umfassen. Als Puffersubstanzen können grundsätzlich alle gebräuchlichen oder dem Fachmann bekannten Puffersubstanzen verwendet werden. Die Konzentration, in der die Puffersubstanzen in der Waschlösung vorliegen beträgt bevorzugt ≤ 250 mM, besonders bevorzugt ≤ 100 mM und am meisten bevorzugt ≤ 40 mM. Die besten Ergebnisse im Hinblick auf die erfindungsgemäße Funktion als Waschlösung werden dann erhalten, wenn die Puffersubstanz in einer Konzentration ≤ 10 mM, bevorzugt ≤ 5 mM und am meisten bevorzugt ≤ 2 mM vorliegt. In Tabelle 1 sind einige Puffersubstanzen, sowie ihre bevorzugten (c_1), besonders bevorzugten (c_2) und am meisten bevorzugten (c_3) Konzentrationsbereiche angegeben.

Tabelle 1

| Puffersubstanz | c_1 [mM] | c_2 [mM] | c_3 [mM] |
|----------------|------------|------------|------------|
| Phosphat | ≤ 40 | ≤ 5 | ≤ 2 |
| Carbonat | ≤ 40 | ≤ 5 | ≤ 2 |
| Mes/Tris | ≤ 100 | ≤ 10 | ≤ 5 |
| Hepes/Tris | ≤ 100 | ≤ 10 | ≤ 5 |

[0014] Für eine weitere Optimierung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist es möglich, in Abhängigkeit von der Art der Wechselwirkung, mit der die Rezeptormoleküle auf der Vorbeschichtung gebunden werden, einen Puffer auszuwählen, der optimale Reaktionsbedingungen gewährleistet. Beispielsweise ist für eine Vorbeschichtung mit Streptavidin der pH-Bereich von 5 bis 9 optimal.

[0015] Erfindungsgemäß können auch Pufferkombinationen verwendet werden, die eine flüchtige Komponente enthalten, wie etwa Essigsäure oder Ameisensäure. Beim Eintrocknen von Pufferresten können solche Pufferkombinationen jedoch auf der Vorbeschichtung zu großen pH-Schwankungen führen, da lediglich ein Bestandteil des Puffers verdampft, während der andere auf der Oberfläche verbleibt. Bevorzugt werden deshalb Pufferkombinationen verwendet, die ausschließlich aus flüchtigen oder ausschließlich aus nichtflüchtigen Komponenten bestehen.

[0016] Zusätzlich oder anstelle von Puffersubstanzen kann die erfindungsgemäß verwendete Waschlösung auch ein Detergenz enthalten. Ein Zusatz von Detergenz zur Waschlösung unterstützt das weitgehend rückstandsfreie Entfernen der Waschlösung von der Vorbeschichtung. Das Detergenz ist in der Waschlösung bevorzugt in einer Konzentration $\leq 0,05$ Vol.-% (bezogen auf das Gesamtvolumen), insbesondere $\leq 0,02$ % (vol-vol), mehr bevorzugt $\leq 0,01$ % (vol-vol) und am meisten bevorzugt $\leq 0,005$ % (vol-vol) enthalten. Die besten Ergebnisse werden erhalten, wenn die Konzentration des Detergenz in der Waschlösung $\leq 0,003$ % (vol-vol), mehr bevorzugt $\leq 0,002$ % (vol-vol) und am meisten bevorzugt $\leq 0,001$ % (vol-vol) beträgt. Die bevorzugten (c_1), besonders bevorzugten (c_2) und am meisten bevorzugten

(c₃) Konzentrationen für einige bevorzugte Detergenzien sind in Tabelle 2 angegeben.

Tabelle 2

| Detergenz | c ₁ [% vol-vol]] | c ₂ [% (vol-vol)] | c ₃ [% (vol-vol)] |
|-----------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Tween 20 | ≤ 0,01 | ≤ 0,005 | ≤ 0,003 |
| n-Octylglucosid | ≤ 0,02 | ≤ 0,01 | ≤ 0,003 |
| Chaps | ≤ 0,01 | ≤ 0,005 | ≤ 0,003 |
| Brj 35 | ≤ 0,005 | ≤ 0,002 | ≤ 0,001 |

[0017] Grundsätzlich sind alle Detergenzien geeignet, ein weitgehend rückstandsfreies Entfernen der Waschlösung zu erzielen. Die Eignung eines bestimmten Detergenz für ein bestimmtes Testformat kann abhängig vom Typ der Beschichtung und dertechnischen Randbedingungen, wie etwa dem Format des Reagenzträgers, der verwendeten Absaugvorrichtung usw. vom Fachmann durch wenige Vorversuche ermittelt werden. Insbesondere muß darauf geachtet werden, daß das Detergenz eine später aufgebraute Flüssigkeit nicht oder nur geringfügig zum Zerfließen bringt. Aus diesem Grund ist beispielsweise bei der Verwendung des Detergenz SDS besondere Aufmerksamkeit, insbesondere hinsichtlich der verwendeten Konzentration angebracht.

[0018] Die erfindungsgemäßverwendete Waschlösung kann auch sonstige Zusätze umfassen, die sich vorteilhaft auf die Verfahrensführung auswirken. Insbesondere können Zusätze verwendet werden, die stabilisierend auf die Vorbeschichtung wirken. Dies ermöglicht eine zeitliche Trennung zwischen der Vorbeschichtung des Reagenzträgers und der Aufbringung der für den jeweiligen Bindeassay spezifischen Beschichtung im Herstellungsverfahren. Beispiele für solche sonstige Zusätze sind Zucker, Salze und Blockreagenzien. Die bevorzugten (c₁), besonders bevorzugten (c₂) und am meisten bevorzugten (c₃) Konzentrationen für diese Substanzen sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3

| Substanz | c ₁ [% (Gew.-Vol)] | c ₂ [% (Gew.-Vol)] | c ₃ 1% (Gew.-Vol)] |
|-----------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Zucker | ≤ 0,5 | ≤ 0,1 | ≤ 0,05 |
| Salze | ≤ 0,5 | ≤ 0,1 | ≤ 0,05 |
| Blockreagenzien | ≤ 0,2 | ≤ 0,02 | ≤ 0,005 |

[0019] Bevorzugte Zucker sind niedermolekulare Zucker, wie etwa Saccharose, mit einem Molekulargewicht ≤ 1000, besonders bevorzugt ≤ 500. Am meisten bevorzugt sind niedermolekulare Zuckeroligomere, die eine, zwei oder drei Zuckereinheiten umfassen.

[0020] Als Salze werden bevorzugt solche verwendet, die während des Eintrocknens nicht zur Kristallbildung neigen, wie etwa Di-Natriumtetrat-dihydrat.

[0021] Als Blockreagenzien werden bevorzugt niedermolekulare Proteine, wie etwa Pepton verwendet.

[0022] Die Konzentration der einzelnen Stoffe in der Waschlösung kann in Abhängigkeit von den spezifischen Testanforderungen, wie etwa Art der Beschichtung, Größe des Testformats usw. eingestellt werden. so wird beispielsweise im Fall von Reagenzträgern mit relativ großen Reaktionsflächen (Durchmesser > 1 cm), bevorzugt reines Wasser oder eine Waschlösung mit relativ geringen Konzentrationen der oben genannten Substanzen (Puffer, Detergenz, sonstige Zusätze) verwendet, um eine möglichst rückstandsfreie Absaugung zu erzielen.

[0023] Bevorzugt wird die wässrige Flüssigkeit über die Vorbeschichtung geleitet und dann vollständig entfernt, z.B. abgesaugt, so daß die Vorbeschichtung trocken zurückbleibt. Bevorzugt wird eine Vorbeschichtung verwendet, die hydrophobe Eigenschaften aufweist.

[0024] Auf die gewaschene Vorbeschichtung wird dann eine zweite Beschichtung aufgebracht, umfassend Rezeptormoleküle, die mit der Vorbeschichtung bindefähig sind, und zwar in Form von räumlich begrenzten Flächen auf dem Reagenzfeld. Die Rezeptormoleküle enthalten bevorzugt den zweiten Partner des Bindepaares, der eine hochaffine Wechselwirkung, z.B. eine immunologische Reaktion, eine Streptavidin/Avidin-Wechselwirkung oder ähnliches oder auch eine kovalente Bindung mit dem als Vorbeschichtung aufgetragenen ersten Partner des Bindepaares eingehen kann. So kann beispielsweise als Vorbeschichtung Streptavidin oder Avidin aufgebracht werden und das Rezeptormolekül enthält dann einen Biotinanteil. Bevorzugt erfolgt die Bindung der Rezeptormoleküle an die Vorbeschichtung mittels hochaffiner Wechselwirkungen mit einer Gleichgewichtskonstante $K_M \geq 10^8$ l/mol. Durch das Aufbringen der

zweiten Beschichtung auf die gewaschene Vorbeschichtung erhält man reproduzierbare, gleichförmige Konturen und Größen der Testflächen.

[0025] Dieser Effekt wird durch die beigefügten Figuren weiter erläutert, worin

- 5 Figur 1 miniaturisierte Testflächen zeigt, die auf herkömmliche Weise ohne Waschschrift hergestellt wurden,
 Figur 2 miniaturisierte Testflächen zeigt, die gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt worden sind
 und
 Figur 3 die Wirkung des Waschschrifts veranschaulicht, wobei Figur 3a ein mit Wasser gefülltes unbeschichtetes
 Enzymun-Teströhrchen (das ist ein unbeschichtetes Polystyrolröhrchen) zeigt, Figur 3b ein mit Wasser
 10 gefülltes Streptavidin beschichtetes Enzymun-Teströhrchen (das ist ein Streptavidin-beschichtetes Polystyrolröhrchen, Boehringer Mannheim, Best.-Nr. 1144553, "Enzymun-Test Streptavidin Tube") zeigt und Figur
 3c ein Streptavidin beschichtetes und anschließend gewaschenes und getrocknetes Enzymun-Teströhrchen, in das Wasser gefüllt wurde, zeigt.

15 [0026] Ein Vergleich der in Figur 1 und Figur 2 gezeigten Testflächen demonstriert deutlich den durch den Waschschrift erhaltenen Vorteil, nämlich daß reproduzierbare, gleichmäßige Spotkonturen von Testflächen auf einem Reagenzfeld erhalten werden können.

[0027] Befüllt man ein unbeschichtetes Enzymun-Teströhrchen mit Wasser, wie in Figur 3a gezeigt, so bildet sich eine
 völlig waagrechte Wasser-Luft-Grenzfläche aus. Dies bedeutet eine geringe Benetzung der Wand mit Wasser. Befüllt
 20 man hingegen ein mit Streptavidin vorbeschichtetes Enzymun-Teströhrchen mit Wasser, so ergibt sich eine stark gekrümmte Wasser-Luft-Grenzfläche, wie in Figur 3b gezeigt. Die Vorbeschichtung führt zu einer hohen Wandbenetzung. Befüllt man ein Teströhrchen, welches zunächst mit Streptavidin vorbeschichtet, dann intensiv mit einer wässrigen Flüssigkeit gewaschen und anschließend getrocknet wurde, so ergibt sich wiederum eine waagrechte Wasser-Luft-Grenzfläche, wie in Figur 3c gezeigt. Die Vorbeschichtung zeigt nach dem Waschschrift hydrophobe Eigenschaften,
 25 weshalb eine geringe Benetzung der Wand mit Wasser erfolgt.

[0028] Als fester, nicht poröser Träger kann erfindungsgemäß jedes feste, nicht poröse Material verwendet werden. Bevorzugt besteht der Träger aus Metall, Glas oder einem Kunststoff, insbesondere aus Polystyrol.

[0029] Die zweite Beschichtung wird bevorzugt in Form von räumlich begrenzten Flächen mit einem Durchmesser
 von 10 µm bis 10 mm aufgebracht. Da sich das erfindungsgemäße Verfahren insbesondere zur Herstellung von minia-
 30 turisierten Testformaten eignet, wird die zweite Beschichtung bevorzugt in Form von räumlich begrenzten Flächen mit einem Durchmesser von 10 µm bis 500 µm, besonders bevorzugt von 20 µm bis 200 µm aufgebracht. Das Aufbringen der zweiten Beschichtung kann mit bekannten Verfahren erfolgen. Zweckmäßigerweise wird die zweite Beschichtung in einer wässrigen Lösung in Form von Mikrotropfen mit einem Volumen zwischen 0,00001 bis 1 µl aufgebracht, z.B. mit Hilfe eines Flüssigkeitstrahlverfahrens. Es ist aber erfindungsgemäß auch möglich, größere Reaktionsgefäße, wie
 35 z.B. Mikrotiterplatten oder Küvetten zu beschichten.

[0030] Bevorzugt wird das Reagenzfeld des festen Trägers vollflächig vorbeschichtet, wonach auf diese vollflächige Vorbeschichtung die zweite Beschichtung in Form von räumlich begrenzten Testflächen aufgebracht wird. Es ist aber auch möglich, bereits die Vorbeschichtung in Form von Spots aufzubringen, was jedoch in einen höheren Aufwand resultiert, da die zweite Beschichtung dann genau auf die vorbeschichteten Flächen positioniert werden muß.

40 [0031] Die Reproduzierbarkeit des erfindungsgemäßen Verfahrens ermöglicht es, Testsysteme bereitzustellen, die mehrere gleiche oder verschiedene Testflächen, insbesondere in miniaturisierter Form enthalten, so daß sowohl die Menge des benötigten Analyten als auch die Analysezeiten deutlich verringert werden können. Es ist deshalb bevorzugt, mehrere räumlich begrenzte Flächen der zweiten Beschichtung auf einen Träger aufzubringen. Die Flächen können dabei alle die gleichen Rezeptormoleküle aufweisen. In diesem Fall kann eine Vielzahl von verschiedenen Proben
 45 gleichzeitig auf einem Testträger untersucht werden. Wenn mindestens zwei der Flächen jeweils unterschiedliche Rezeptormoleküle aufweisen, können in einer Probe mehrere Analyten parallel bestimmt werden. Bei solchen Systemen ist es besonders wichtig, räumlich scharf begrenzte Testflächen zu erzeugen und jegliches Verschmieren der Rezeptormoleküle zu vermeiden. Nur so kann sichergestellt werden, daß tatsächlich der gewünschte Analyt, der an eine spezifische Testfläche bindet, bestimmt wird und nicht eine Kontamination benachbarter Flächen mit
 50 Rezeptormolekülen anderer Testflächen zu falschen Resultaten führt.

[0032] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Festphase, die durch das zuvor beschriebene Verfahren erhältlich ist, umfassend eine Vorbeschichtung auf einen festen Träger und eine an die Vorbeschichtung in Form von mehreren, kreisförmigen räumlich begrenzten Flächen gebundene zweite Beschichtung, welche dadurch gekennzeichnet ist, daß die zweite Beschichtung an die Vorbeschichtung gebundene Rezeptormoleküle umfaßt und daß der Durchmesser
 55 der Flächen der zweiten Beschichtung 10 µm bis 10 mm beträgt und von Fläche zu Fläche weniger als 10%, bevorzugt um weniger als 5% und besonders bevorzugt um weniger als 2,5% variiert. Besonders bevorzugt wird diese Festphase in einem miniaturisierten Testsystem verwendet, wobei der Durchmesser der Testflächen 10 bis 500 µm, bevorzugt 20 bis 200 µm beträgt.

[0033] Weiterhin umfaßt die Erfindung die Verwendung einer solchen Festphase zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten, insbesondere in Bindungsassays, wie etwa einem Immunoassay, einem Nukleinsäurehybridisierungsassay usw.

[0034] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Verbesserung der Gleichmäßigkeit räumlich begrenzter Beschichtungsflächen auf einem festen, insbesondere nicht porösen Träger, umfassend die Schritte:

- (a) Aufbringen einer Vorbeschichtung auf ein Reagenzfeld des festen Trägers,
- (b) Waschen des vorbeschichteten Trägers mit einer wässrigen Flüssigkeit und
- (c) Aufbringen einer zweiten Beschichtung, die mit der Vorbeschichtung bindefähig sind, auf den vorbeschichteten Träger in Form von räumlich begrenzten Flächen auf dem Reagenzfeld.

[0035] Ein Problem, das häufig bei der Herstellung oder/und Verwendung von Festphasen für Bindeassays auftritt, ist das Verschmieren von Rezeptormolekülen außerhalb der dafür vorgesehenen, räumlich begrenzten Flächen beim Aufbringen einer Nachbeladelösung.

[0036] Ein zweiter Aspekt der Erfindung betrifft deshalb ein Verfahren zur Vermeidung des Verschmierens von räumlich begrenzten Festphasen, welche durch Aufbringen einer Rezeptormoleküle enthaltenden Beschichtungslösung auf vorbestimmte begrenzte Bereiche eines festen Trägers und anschließendes Behandeln mit einer Nachbeladelösung erzeugt werden, umfassend mindestens eine der Maßnahmen:

- (a) Aufbringen der Beschichtungslösung, auf eine Weise, so daß eine im wesentlichen quantitative Bindung der Rezeptormoleküle innerhalb der vorbestimmten begrenzten Bereiche erfolgt oder/und
- (b) Verhinderung der erneuten Bindung von eluierten Rezeptormolekülen aus den vorbestimmten begrenzten Bereichen bei Aufbringung einer Nachbehandlungslösung.

[0037] Überraschenderweise wurde festgestellt, daß unter Verwendung mindestens einer dieser Maßnahmen das Verschmieren von räumlich begrenzten Festphasen vermieden werden kann, was in scharf begrenzten Testflächen mit reproduzierbaren Konturen und Größen resultiert. Dieses Verfahren kann sowohl für einlagige als auch für mehrlagige Beschichtungen verwendet werden.

[0038] Rezeptormoleküle werden im Allgemeinen in wässriger Lösung in Form kleiner Tröpfchen auf einen festen Träger aufgetragen, der gegebenenfalls vorbeschichtet sein kann. Aus der Lösung heraus diffundieren die Rezeptormoleküle dann an den festen Träger bzw. an die Vorbeschichtung und binden an diese. Diese Bindungswechselwirkung kann eine hochaffine Wechselwirkung wie etwa eine immunologische Reaktion oder eine Streptavidin/Avidin-Biotin-Wechselwirkung oder eine kovalente Bindung sein. Bei herkömmlichen Festphasensystemen des Standes der Technik bewirken Nachfolgeprozesse nach dem Aufbringen der Beschichtung z.B. bei der Versuchsdurchführung zur Analyse eines Analyten oder das Aufbringen einer Nachbeladelösung eine Elution ungebundener oder nicht genügend gebundener Moleküle von der Festphase.

[0039] Eine spezifisch beschichtete Festphase wird üblicherweise mit einer Nachbeladelösung behandelt, deren Aufgabe es ist, unspezifische Bindestellen abzublocken und die Rezeptormoleküle gegen äußere Einflüsse zu stabilisieren. Dies ist notwendig, da die Testflächen des Reagenzfeldes einer Festphase zumeist nicht vollständig zu 100% belegt sind. Freibleibende Stellen des Trägers bzw. der Vorbeschichtung stellen jedoch unspezifische Bindungsstellen dar, an die andere Probenbestandteile als der gewünschte Analyt binden können.

[0040] Weiterhin enthält eine Beschichtung mit Rezeptormolekülen zumeist auch einen geringen Anteil geschädigter Moleküle, an die andere Probenbestandteile als der erwünschte Analyt unspezifisch binden können. Durch Aufbringen einer Nachbeladelösung, welche beispielsweise Inertproteine enthält, werden solche Stellen blockiert, so daß die spätere Anlagerung von Probenbestandteilen während der Analyse verhindert wird. Zudem dient eine Nachbeladelösung oftmals auch zur Stabilisierung der Rezeptormoleküle bzw. der Beschichtung gegen äußere Einflüsse wie etwa Temperatur oder Feuchtigkeit. In vielen Ausführungsformen von Analysesystemen, wie z.B. Mikrotiterplatten oder ES-Tubes liegen Verfahrensabläufe vor, in denen die Nachbeladelösung sowohl blockierende als auch stabilisierende Aufgaben erfüllt.

[0041] Während die Verwendung einer Nachbeladelösung für viele Testformate notwendig ist, ist damit zugleich oftmals das Verschmieren der zuvor aufgetragenen Rezeptormoleküle verbunden. Das Aufbringen der Nachbeladelösung bewirkt eine Elution ungebundener oder ungenügend gebundener Rezeptormoleküle. Diese eluierten Rezeptormoleküle können dann unerwünschterweise an beliebigen noch zugänglichen Stellen des festen Trägers bzw. der Vorbeschichtung binden und führen somit zu einem Verschmieren von zuvor räumlich begrenzten Festphasen, da sich die Rezeptormoleküle auch außerhalb des Primärauftrags anlagern können. Ein solches Verschmieren ist insbesondere dann von großem Nachteil, wenn auf einem Träger mehrere räumlich begrenzte Flächen aufgebracht sind, die jeweils unterschiedliche Rezeptormoleküle aufweisen. Die Elution von Rezeptormolekülen und Bindung von eluierten Rezeptormolekülen an anderen Stellen der Festphase kann zu einer Vermischung der Rezeptoren in den Testflächen führen,

so daß kein eindeutiges Analyseergebnis erhalten wird. Dieses Problem tritt insbesondere bei miniaturisierten Testformaten auf. Auch bei Tests, bei denen keine Nachbeladelösung verwendet wird, treten die gleichen Probleme auf, nämlich spätestens zu dem Zeitpunkt, an dem eine Probenlösung aufgebracht wird.

[0042] Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß durch Aufbringen einer Beschichtungslösung, wobei eine im wesentlichen quantitative Bindung der Rezeptormoleküle innerhalb vorbestimmter Bereiche erfolgt, das Verschmieren der räumlich begrenzten Festphasen vermieden werden kann. Durch eine nahezu 100%ige Bindung der Rezeptormoleküle kann deren Elution verhindert werden. Bevorzugt werden die Rezeptormoleküle zu mehr als 90 %, besonders bevorzugt zu mehr als 95 % und am meisten bevorzugt zu mehr als 99 % gebunden. Eine im wesentlichen quantitative Bindung der Rezeptormoleküle wird bevorzugt durch die Verwendung einer Beschichtungslösung erzielt, die eine Konzentration an Rezeptormolekülen aufweist, die geringer als die Grenzkonzentration ist, die ausreicht um den vorbestimmten Bereich vollständig zu belegen. Wenn die Beschichtungslösung weniger Rezeptormoleküle enthält als an der Testfläche bindet, so werden alle aufgetragenen Rezeptormoleküle in der Testfläche gebunden und es liegen keine ungebundenen oder ungenügend gebundenen Rezeptormoleküle vor, die später, beispielsweise durch eine Nachbeladelösung, eluiert werden können. Grenzkonzentrationen für verschiedene Rezeptormoleküle sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4

| Grenzkonzentrationen unterschiedlicher Beschichtungsmoleküle | | | |
|--|-------------------|--------------------|------------------|
| Rezeptormolekül | Durchmesser 10 µm | Durchmesser 100 µm | Durchmesser 1 mm |
| Antikörper | 2,5 mg/ml | 250 µg/ml | 25 µg/ml |
| Antigen (z.B. p24) | 600 µg/ml | 60 µg/ml | 6 µg/ml |
| Peptid (MG 3000) | 150 µg/ml | 15 µg/ml | 1,5 µg/ml |

[0043] Bevorzugt wird eine Beschichtungslösung verwendet, die eine Konzentration an Rezeptormolekülen enthält, die kleiner als die Grenzkonzentration ist, bevorzugt kleiner als 50% und besonders bevorzugt kleiner als 25% der Grenzkonzentration.

[0044] Weiterhin ist es bevorzugt, stark bindende Rezeptormoleküle zu verwenden, beispielweise vernetzte Antikörper anstelle von monomeren Antikörpern. Insbesondere durch das Vernetzen von Antikörpern zu Polymeren mit einem Molekulargewicht von > 1,2 Millionen Dalton kann ein Verschmieren verhindert werden, da gefunden wurde, daß hochvernetzte Proteine sehr gut an feste Träger, insbesondere an Kunststoffoberflächen binden. Besonders bevorzugt wird als Rezeptormolekül rekombinantes HBc-Antigen verwendet, wobei durch Selbstaggregation Makromoleküle im Bereich von mehreren Millionen Dalton gebildet werden, sowie tRSA-Konjugate, wie etwa tRSA-Biotin, tRSA-Streptavidin oder tRSA-Anti-TSH-Antikörper. In allen Fällen wurde eine nahezu 100%-ige Bindung und damit keinerlei Verschmierung von Rezeptormolekülen außerhalb der Zielfläche gefunden.

[0045] Die Rezeptormoleküle können unmittelbar auf den festen Träger oder auf eine auf den festen Träger aufgetragene Vorbeschichtung aufgebracht werden. Im Falle einer Vorbeschichtung ist es bevorzugt, Rezeptormoleküle zu verwenden, die eine hohe Bindungsaffinität von mindestens 10^8 l/mol an die Vorbeschichtung aufweisen.

[0046] Weiterhin wurde gefunden, daß ein Verschmieren von räumlich begrenzten Festphasen durch Zugabe eines Eluationsverzögerers zu der Beschichtungslösung verhindert werden kann. Unter Eluationsverzögerern werden Substanzen verstanden, die nach Eintrocknen der Beschichtungslösung einen Überzug über der Testfläche bilden und so eine unmittelbare Eluierung ungebundener oder nicht genügend gebundener Rezeptormoleküle bei Zugabe einer Nachbeladelösung oder Probelösung verhindern oder verzögern. Geeignete Eluationsverzögerer sind beispielsweise Saccharide wie etwa Saccharose, PVP (Polyvinylpyrrolidon) oder Dextran, welches bevorzugt ein Molekulargewicht von 10 000 bis 100 000 Da aufweist. Weitere geeignete Eluationsverzögerer sind Gelatine und Zellulosederivate, insbesondere Methylcellulose, die bevorzugt dann eingesetzt werden, wenn die Rezeptormoleküle mit einer zuvor aufgetragenen Vorbeschichtung reagieren. Durch die Zugabe eines Eluationsverzögerers wird die Eluierung ungebundener Rezeptormoleküle wenigstens solange hinausgezögert, bis alle freien Stellen auf den festen Träger durch geeignete Maßnahmen blockiert worden sind, so daß eluierte Rezeptormoleküle nicht mehr binden können und ausgewaschen werden.

[0047] In einem zweiten Aspekt wird das erneute Binden von eluierten Rezeptormolekülen aus vorbestimmten Bereichen bei Aufbringen einer Nachbeladelösung verhindert. Dies wird bevorzugt durch Zugabe einer Blockierungssubstanz zur Nachbeladelösung erreicht. Hierbei ist es wesentlich, dafür zu sorgen, daß die Bindung der Blockierungssubstanzen möglichst schnell erfolgt. Dies kann dadurch erreicht werden, daß man die Nachbeladelösung mit hohen Konzentrationen von $\geq 0,5$ Gew.-%, bevorzugt ≥ 1 Gew.-% an einer Blockierungssubstanz versetzt, beispiels-

weise mit 1 Gew.-% RSA (Rinderserumalbumin), Crotein C, Kasein etc. Weitere geeignete Blockierungssubstanzen sind z.B. Pepton, Rinder IgG, Kaninchen IgG, Collagen, Gelatine, Polyethylenglykol und Detergenzien, wie etwa Tween 20.

5 [0048] Die Bindungskinetik der Blockierungssubstanz, insbesondere von Blockproteinen kann auch durch geeignete Pufferzusätze, wie etwa 3% $MgCl_2$ verbessert werden. Wenn die Beschichtungslösung nicht direkt auf den festen Träger, sondern auf eine Vorbeschichtung aufgebracht wird, werden Blockierungssubstanzen gewählt, die spezifisch mit der Vorbeschichtung reagieren. Anstelle bzw. zusätzlich zu unspezifischen Blockierungssubstanzen, wie etwa Blockproteinen, kann durch solche spezifischen Blocksubstanzen, die mit der Vorbeschichtung spezifisch bindefähig sind, die Blockierungswirkung noch verbessert werden. Hierzu wird beispielsweise auf eine Streptavidinvorbeschichtung
10 eine biotinylierte Rezeptormoleküle enthaltende Lösung aufgebracht. Nach dem Eintrocknen wird darauf eine Biotinlösung aufgetragen, durch die die noch freien Streptavidin-Bindestellen abgesättigt werden.

[0049] Schließlich ist es erfindungsgemäß auch möglich, das Verschmieren von räumlich begrenzten Festphasen durch Aufbringen der Nachbeladelösung innerhalb einer geringen Zeitdauer zu verhindern, so daß eluierte Rezeptormoleküle unmittelbar stark verdünnt werden. Die maximale Zeitdauer beträgt dabei im Allgemeinen 500 msec, bevorzugt 250 msec und besonders bevorzugt 50 msec. Hier ist es von Vorteil, für eine schnelle Durchmischung zu sorgen, um in der Nachbeladelösung Bereiche mit hoher lokaler Konzentration an eluierten Rezeptormolekülen zu verhindern. Eine effiziente Mischung ist beispielsweise dadurch zu erreichen, daß die Nachbeladelösung mit einer möglichst hohen Strömungsgeschwindigkeit aufgebracht wird, wodurch ein möglichst kurzer zeitlicher Kontakt zwischen Nachbeladelösung und Testflächen gewährleistet wird.

20 [0050] Besonders bevorzugt werden mehrere der angegebenen Maßnahmen in Kombination eingesetzt, um ein Binden von eluierten Rezeptormolekülen außerhalb der vorgesehenen Testflächen zu verhindern. Als besonders vorteilhaft hat es sich erwiesen, der Beschichtungslösung einen Eluationsverzögerer und der Nachbeladelösung eine Blockierungssubstanz zuzusetzen und gleichzeitig für eine schnelle Durchmischung der Nachbeladelösung zu sorgen.

[0051] Da dieses Verfahren insbesondere bei miniaturisierten Testformaten vorteilhaft ist, weisen die räumlich begrenzten Festphasen bevorzugt einen Durchmesser von 10 bis 500 μm , besonders bevorzugt von 20 bis 200 μm auf.

25 [0052] Die Erfindung umfaßt auch eine durch das oben beschriebene Verfahren zur Vermeidung des Verschmierens von räumlich begrenzten Festphasen erhältliche Festphase, welche durch Aufbringen einer Rezeptormoleküle enthaltenden Beschichtungslösung auf vorbestimmte Bereiche eines festen Trägers und anschließendes Behandeln mit einer Nachbeladelösung erzeugt wird, wobei die Rezeptormoleküle in räumlich begrenzten Flächen angeordnet sind, welche
30 dadurch gekennzeichnet ist, daß sich $\geq 80\%$, insbesondere $\geq 90\%$ und besonders bevorzugt $\geq 95\%$ der Rezeptormoleküle innerhalb der räumlich begrenzten Flächen befinden. Eine solche Festphase ermöglicht zuverlässige und reproduzierbare Analyseergebnisse. Eine solche Festphase kann zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten verwendet werden.

[0053] Eine weitere häufige Ursache für falsche Ergebnisse bei Bindungsassays sind unspezifische Bindungen, d.h. Bindungen von Probenbestandteilen außer dem gewünschten Analyten, an mit Streptavidin oder Avidin beschichtete Festphasen.

35 [0054] Die vorliegende Erfindung betrifft deshalb auch ein Verfahren zur Verringerung der unspezifischen Bindung an eine mit Streptavidin oder Avidin beschichtete Festphase, umfassend die Schritte

- 40 (a) Aufbringen eines aus einem Makromolekül und Biotin bestehenden Konjugats und
(b) Aufbringen von monomerem Streptavidin oder Avidin auf die Festphase.

[0055] Überraschenderweise wurde festgestellt, daß durch dieses Verfahren eine deutliche Verringerung von unspezifischer Bindungen an eine mit einer Streptavidin oder Avidin beschichtete Festphase erreicht werden kann. Die Verwendung von monomerem Streptavidin verringert insbesondere die unspezifische Bindung von Konjugaten und anderen Probenbestandteilen an die Festphase erheblich.

45 [0056] Bevorzugt wird das aus einem Makromolekül, wie etwa tRSA, und Biotin bestehende Konjugat als wässrige Lösung in Form von Mikrotröpfchen auf einen festen Träger aufgebracht. Bevorzugt wird dabei ein Konjugat verwendet, das ein Makromolekül und Biotin im Verhältnis 1:1 bis 1:3, besonders bevorzugt 1:1 bis 1:2 umfaßt. Durch eine solche
50 niedrige Biotinylierungs-Stöchiometrie des Klettproteins kann die unspezifische Bindung, insbesondere von Konjugaten weiter wesentlich verringert werden.

[0057] Das erfindungsgemäße Verfahren zur Verringerung der unspezifischen Bindung an eine mit Streptavidin oder Avidin beschichtete Festphase eignet sich insbesondere auch für miniaturisierte Testformate, wobei die Festphase bevorzugt einen Durchmesser von ≤ 10 mm, besonders bevorzugt ≤ 5 mm aufweist.

55 [0058] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Festphase, erhältlich durch das oben beschriebene Verfahren, welche dadurch gekennzeichnet ist, daß sie eine Vorbeschichtung eines aus einem Makromolekül und Biotin bestehenden Konjugats und darauf eine Schicht von monomerem Streptavidin oder Avidin aufweist. Eine solche Festphase wird insbesondere zum Nachweis eines Analyten verwendet.

[0059] Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele weiter erläutert:

Beispiele

5 Beispiel 1 Herstellung von Spots auf einer streptavidinbeschichteten Oberfläche

[0060] Die Testflächen wurden mit einer Beschichtungslösung beaufschlagt, die eine hochmolekulare Verbindung RSA-Streptavidin mit einer Partikelgröße von ca. 100 nm enthielt. Nach einer Reaktionszeit von 15 min wurde die Beschichtungslösung abgesaugt und die Testflächen mit einer Lösung bestehend aus 0,05 % NaCl, 0,2% Saccharose und 0,05% RSA geblockt. Bei der in Fig. 1 gezeigten Testfläche wurde nach einer Inkubationszeit der Vorbeschichtung von 5 min nur trocken gesaugt, während bei den in Fig. 2 gezeigten Testflächen ein erfindungsgemäßer Waschschr

Beispiel 2

15 [0061] 3,7 g Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan und 4,75 g MES (2-Morpholinoethansulfonsäure) werden in 5 l Wasser gelöst. Mit 5 ml dieses Waschpuffers wird ein vorbeschichtetes Reaktionsgefäß mit einem Nennvolumen von 50 µl überströmt. Anschließend wird das Reaktionsgefäß mit einer oder mehreren Absaugnadeln trockengesaugt. Durch Aufbringen einer zweiten Beschichtung auf die gewaschene und getrocknete Vorbeschichtung erhält man räumlich eng begrenzte Testflächen, wie sie beispielsweise in Figur 2 dargestellt sind.

Beispiel 3

25 [0062] Auf einen festen Träger wird eine Streptavidinvorbeschichtung aufgebracht. Auf diese Beschichtung wird eine Beschichtungslösung mit mono-biotinylierte Antikörper in Form kleiner Tröpfchen aufgegeben. Nachdem die Tröpfchen eingetrocknet sind, wird darauf eine Lösung gegeben, die 3 mg/ml Biotin in 50 mM K₂HPO₄ enthält. Nach einigen Sekunden wird die Biotinlösung entfernt und eine Lösung mit 1% RSA (Rinderserumalbumin) und 2% Saccharose aufgebracht, welche nach wenigen Sekunden ebenfalls entfernt wird. Anschließend wird das System getrocknet. Auf diese Weise werden räumlich scharf begrenzte Festphasen erhalten, ohne Verschmierung von Rezeptormolekülen außerhalb der gewünschten Reaktionsfläche.

Beispiel 4

35 [0063] Es wurden unspezifische Bindungen auf verschiedenen Streptavidin-Festphasen untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Tabelle 5

| Beschichtungs-Typ | TSH-Konjugat | p24-Konjugat | Human-IgG |
|--------------------------------------|--------------|--------------|-----------|
| tRSA-Streptavidin | 24 | 31 | 105 |
| tRSA-Biotin + polymeres Streptavidin | 3 | 71 | 63 |
| tRSA-Biotin + monomeres Streptavidin | 0 | 4 | 38 |

45 [0064] Wie deutlich zu sehen ist, kann durch die erfindungsgemäße Kombination aus Konjugat und monomerem Streptavidin eine deutliche Verringerung der unspezifischen Bindung erzielt werden.

Beispiel 5 Direktbeschichtung

50 [0065] Zunächst wird ein Polyhaptan durch Kopplung mehrerer identischer Peptide an RSA hergestellt. Das Polyhaptan wird auf 50 µg/ml in einen Puffer umfassend 5 mM Mes, 5 mM Tris und 1 % Saccharose gelöst. Anschließend werden Tröpfchen mit einem Volumen von 150 µl auf einen Polystyrolträger aufgebracht, für ca. 5 s inkubiert und für etwa 60 s getrocknet. Anschließend wird eine Blocklösung bestehend aus 1% RSA und 2% Saccharose aufgebracht und für 10 s inkubiert. Anschließend wird abgesaugt und eine Blocklösung, bestehend aus 1% RSA und 2% Saccharose zugegeben. Anschließend wird abgesaugt und getrocknet.

Beispiel 6 Streptavidin-Vorbeschichtung

[0066] Zunächst wird ein biotinyliertes Makromolekül (z.B. thermisch aggregiertes RSA) in einer Konzentration von 100 µg/ml in PBS auf einen Polystyrolträger mit 50 µl Nennvolumen aufgebracht und 5 min inkubiert. Anschließend wird abgesaugt und eine Streptavidinlösung mit einer Konzentration von 100 µg/ml in PBS zugegeben. Nach 5 min Inkubation erfolgt ein Waschschriff mit anschließendem Trockensaugen.

[0067] Unterschiedliche, biotinylierte DNA-Fangsonden (18-mer) werden in einer Konzentration von 1 µM in einen Puffer aus 5 mM Mes, 5 mM Tris, 1% Saccharose und 0,5 mg/ml RSA gelöst. Anschließend werden Tröpfchen mit einem Volumen von ca. 150 pl in Form eines Arrays auf einen Polystyrolträger aufgebracht. Nach einer Inkubation für ca. 5 s und Trocknen für ca. 60 s wird eine Lösung bestehend aus 3 mg/ml Biotin in 50 mM Dikaliumphosphat zugegeben und für 2 s inkubiert. Anschließend wird abgesaugt und eine Blocklösung, bestehend aus 1% RSA und 2% Saccharose zugegeben, abgesaugt und getrocknet.

Beispiel 7 Vorbeschichtung mit Anti-Maus-Antikörpern

[0068] PAK Maus-F_{cy} S IgG werden in einer Konzentration von 30 µg/ml in einem Puffer umfassen 40 mM Kaliumphosphat bei einem pH-Wert von 7,4 in 0,9% Natriumchlorid gelöst. Diese Lösung wird in ein Reaktionsgefäß mit 50 µl Nennvolumen aufgebracht. Nach 15 minütiger Inkubation und anschließendem Absaugen erfolgt die Zugabe einer Blocklösung bestehend aus 1% RSA und 2% Saccharose. Nach 5 min Inkubation erfolgt erfindungsgemäß ein Waschschriff mit anschließendem Trockensaugen.

[0069] Ein Fusionsprotein (Maus-F_{cy} + CD28) wird in einem Puffer umfassend 5 mM Mes, 5 mM Tris, 1% Saccharose und 0,5 mg/ml RSA auf 100 µg/ml gelöst. Es werden Tröpfchen mit einem Volumen von ca. 150 pl auf den zuvor beschriebenen, beschichteten Polystyrolträger aufgebracht und für ca. 5 s inkubiert. Nach Trocknen für ca. 60 s erfolgte die Zugabe einer Blocklösung bestehend aus 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, 100 µg/ml Maus IgG, 1 mg/ml RSA. Nach Inkubation für 10 s wird abgesaugt und eine Blocklösung bestehend aus 1% RSA, 2% Saccharose zugegeben, abgesaugt und getrocknet.

Beispiel 8 Universelle Streptavidin-Testflächen

[0070] Ein Makromolekül von ca. 100 nm Partikelgröße, bestehend aus RSA und Streptavidin wird auf eine Konzentration von 500 µg/ml in 20 mM Phosphatpuffer pH 7,4 und 1% Saccharose gelöst. Tröpfchen mit einem Volumen von etwa 150 pl werden auf einen Polystyrolträger aufgebracht, für ca. 5 s inkubiert und für ca. 60 s getrocknet. Anschließend wird eine Lösung, bestehend aus 1% RSA und 2% Saccharose zugegeben, für ca. 10 s inkubiert und abgesaugt. Dann wird eine Lösung bestehend aus 1% RSA, 2% Saccharose, 1 µg/ml biotinylierter Anti-TSH-Antikörper zugegeben, für 20 min inkubiert und abgesaugt. Schließlich wird eine Blocklösung bestehend aus 1% RSA und 2% Saccharose zugegeben, abgesaugt und getrocknet. Das Ergebnis ist eine hochpräzise, miniaturisierte TSH-spezifische Festphase.

Beispiel 9 Testflächen für Anti-Rubella-Antikörper

[0071] Ein biotinyliertes Makromolekül (z.B. thermisch aggregiertes RSA) wird in einer Konzentration von 100 µg/ml in PBS auf einen Polystyrolträger mit 50 µl Nennvolumen aufgebracht, 5 min inkubiert und abgesaugt. Anschließend wird eine Streptavidinlösung mit einer Konzentration von 100 µg/ml in PBS zugegeben. Nach 5 min Inkubation erfolgt erfindungsgemäß ein Waschschriff mit anschließendem Trockensaugen.

[0072] Ein biotinylierter Anti-Rubella-Antikörper wird auf eine Konzentration von 50 µg/ml in einen Puffer aus 5 mM Mes, 5 mM Tris, 1% Saccharose und 0,5 mg/ml RSA gelöst. Tröpfchen mit einem Volumen von ca. 150 pl werden auf dem zuvor beschriebenen Träger aufgebracht. Es erfolgt eine Inkubation für ca. 5 s und ein Trocknen für ca. 60 s. Anschließend wird eine Lösung bestehend aus 3 mg/ml Biotin in 50 mM Dikaliumphosphat zugegeben, für 2 s inkubiert und abgesaugt. Dann wird eine Lösung, bestehend aus 0,1% Tween 20, 1% RSA, 3 U/ml Virus-Lysat (Rubella-Virus) in PBS zugegeben, für 20 min inkubiert und dann abgesaugt. Anschließend wird eine Blocklösung, bestehend aus 1% RSA und 2% Saccharose zugegeben, abgesaugt und getrocknet.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Aufbringen einer mehrlagigen Beschichtung auf einen festen, nicht porösen Träger, umfassend die Schritte:

(a) Aufbringen einer Vorbeschichtung auf ein Reagenzfeld des festen Trägers,

- (b) Waschen des vorbeschichteten Trägers mit einer wässrigen Flüssigkeit und
- (c) Aufbringen einer zweiten Beschichtung, umfassend Rezeptormoleküle, die mit der Vorbeschichtung bindet, auf den vorbeschichteten Träger in Form von räumlich begrenzten Flächen auf dem Reagenzfeld.

- 5 2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß die zweite Beschichtung in Form von räumlich begrenzten Flächen mit einem Durchmesser von 10 µm bis 10 mm aufgebracht wird.
- 10 3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß der feste Träger mit einem ersten Partner eines spezifischen Bindepaares vorbeschichtet wird und das Rezeptormolekül den zweiten Partner umfaßt.
- 15 4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß mehrere räumlich begrenzte Flächen der zweiten Beschichtung auf einen Träger aufgebracht werden, wobei mindestens zwei der Flächen jeweils unterschiedliche Rezeptormoleküle aufweisen.
- 20 5. Festphase, erhältlich durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, umfassend eine Vorbeschichtung auf einem festen, nichtporösen Träger und eine an die Vorbeschichtung in Form von mehreren, kreisförmigen räumlich begrenzten Flächen gebundene zweite Beschichtung,
dadurch gekennzeichnet,
25 daß die zweite Beschichtung an die Vorbeschichtung gebundene Rezeptormoleküle umfaßt und daß der Durchmesser der Flächen der zweiten Beschichtung 10 µm bis 10 mm beträgt und von Fläche zu Fläche um weniger als 10% variiert.
6. Verwendung einer Festphase nach Anspruch 5 zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten.
- 30 7. Verfahren zur Verbesserung der Gleichmäßigkeit räumlich begrenzter Beschichtungsflächen auf einem festen Träger, umfassend die Schritte:
 - (a) Aufbringen einer Vorbeschichtung auf ein Reagenzfeld des festen Trägers,
 - (b) Waschen des vorbeschichteten Trägers mit einer wässrigen Flüssigkeit und
 - 35 (c) Aufbringen einer zweiten Beschichtung, die mit der Vorbeschichtung bindet, auf den vorbeschichteten Träger in Form von räumlich begrenzten Flächen auf dem Reagenzfeld.
- 40 8. Verfahren zur Vermeidung des Verschmierens von räumlich begrenzten Festphasen, welche durch Aufbringen einer Rezeptormoleküle enthaltenden Beschichtungslösung auf vorbestimmte Bereiche eines festen Trägers und anschließendes Behandeln mit einer Nachbeladungslösung erzeugt werden, umfassend mindestens eine der Maßnahmen:
 - (a) Aufbringen der Beschichtungslösung auf eine Weise, so daß eine im wesentlichen quantitative Bindung der Rezeptormoleküle innerhalb vorbestimmter begrenzter Bereiche erfolgt oder/und
 - 45 (b) Verhinderung der erneuten Bindung von eluierten Rezeptormolekülen aus den vorbestimmten begrenzten Bereichen bei Aufbringen einer Nachbeladungslösung.
- 50 9. Verfahren nach Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß eine Beschichtungslösung aufgebracht wird, die eine Konzentration an Rezeptormolekülen von kleiner als 90% der Grenzkonzentration enthält, die ausreicht, um den vorbestimmten Bereich vollständig zu belegen.
- 55 10. Festphase, erhältlich durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 9, welche durch Aufbringen einer Rezeptormoleküle enthaltenden Beschichtungslösung auf vorbestimmte Bereiche eines festen Trägers und anschließendes Behandeln mit einer Nachbeladungslösung erzeugt wird, wobei die Rezeptormoleküle in räumlich begrenzten Flächen angeordnet sind,
dadurch gekennzeichnet,
daß sich $\geq 80\%$ der Rezeptormoleküle innerhalb der räumlich begrenzten Flächen befinden.

11. Verfahren zur Verringerung der unspezifischen Bindung an eine mit Streptavidin oder Avidin beschichteten Festphase, umfassend die Schritte:

- (a) Aufbringen eines aus einem Makromolekül und Biotin bestehenden Konjugats und
- (b) Aufbringen von monomerem Streptavidin oder Avidin auf die Festphase.

Fig. 1

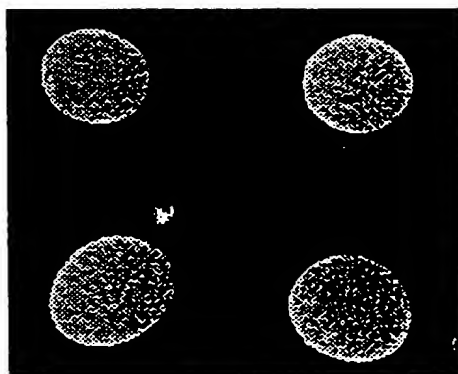


Fig. 2

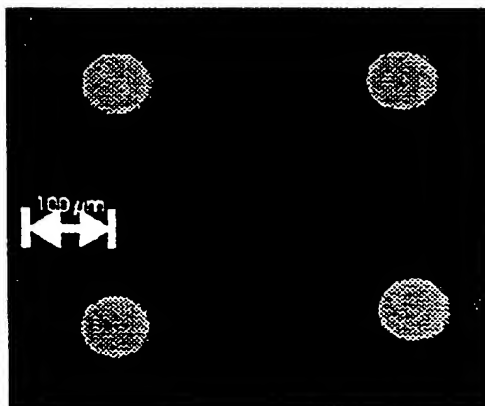


Fig. 3

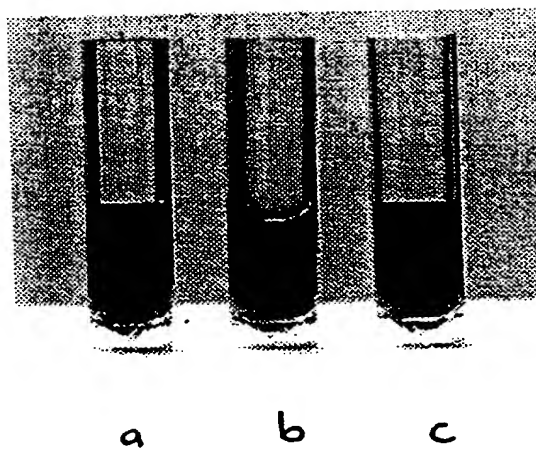


Fig. 1

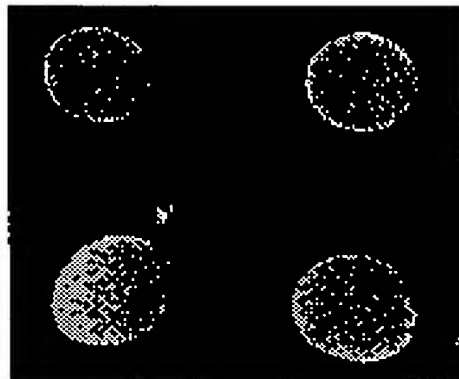


Fig. 2

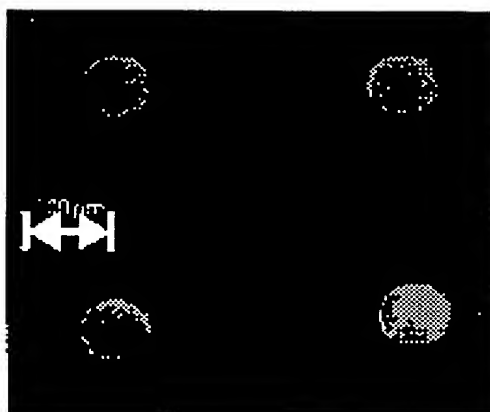
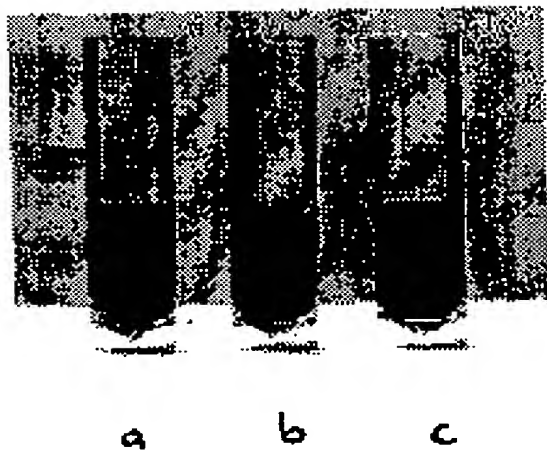
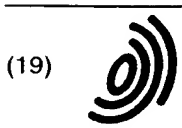


Fig. 3





Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) **EP 0 939 319 A3**

(12) **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(88) Veröffentlichungstag A3:
14.03.2001 Patentblatt 2001/11

(51) Int. Cl.⁷: **G01N 33/543**

(43) Veröffentlichungstag A2:
01.09.1999 Patentblatt 1999/35

(21) Anmeldenummer: **99103135.2**

(22) Anmeldetag: **17.02.1999**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE**
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: **19.02.1998 DE 19806989**

(71) Anmelder: **Roche Diagnostics GmbH
68305 Mannheim (DE)**

(72) Erfinder: **Hornauer, Hans Dr.
82380 Peissenberg (DE)**

(74) Vertreter:
**Weiss, Wolfgang, Dipl.-Chem. Dr. et al
Weickmann & Weickmann
Patentanwälte
Postfach 86 08 20
81635 München (DE)**

(54) **Erzeugung räumlich scharf begrenzter Festphasen für Bindungsassays**

(57) Es wird ein Verfahren zum Aufbringen einer mehrlagigen Beschichtung auf einen festen, nicht porösen Träger, ein Verfahren zur Vermeidung des Verschmierens von räumlich begrenzten Festphasen sowie ein Verfahren zur Verringerung der unspezifischen Bindung an eine beschichtete Festphase beschrieben.

EP 0 939 319 A3



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 99 10 3135

| EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE | | | |
|---|--|---|--|
| Kategorie | Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile | Betrifft Anspruch | KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6) |
| D,X | EP 0 427 984 A (QUIDEL) 22. Mai 1991 (1991-05-22) * Zusammenfassung * * Spalte 2, Zeile 31-40 * * Spalte 3, Zeile 58 - Spalte 4, Zeile 7 * * Spalte 5, Zeile 37-45 * * Spalte 5, Zeile 49 - Spalte 6, Zeile 11 * * Spalte 6, Zeile 17-34 * --- | 1,3,4,7 | G01N33/543 |
| D,X | US 4 591 570 A (CHANG TSE-WEN) 27. Mai 1986 (1986-05-27) * Zusammenfassung * * Spalte 2, Zeile 44-53 * * Spalte 3, Zeile 44-51 * * Spalte 4, Zeile 4-66 * --- | 1-7 | |
| X | EP 0 529 775 A (OKI ELECTRIC IND CO LTD) 3. März 1993 (1993-03-03) * Zusammenfassung * * Spalte 10, Zeile 31 - Spalte 11, Zeile 56 * * Spalte 14, Zeile 42 - Spalte 17, Zeile 19 * --- | 1,3 | RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6) G01N |
| X | AKMAN SERIF ET AL: "An enzymeimmunoassay for total thyroxine using avidin-biotin separation system and thyroxine-peroxidase conjugate." JOURNAL OF IMMUNOASSAY, Bd. 16, Nr. 3, 1995, Seiten 325-341, XP000945253 ISSN: 0197-1522 * Zusammenfassung * * Seite 329, Absatz 2 - Seite 330, Absatz 1 * * Seite 331, Absatz 3 - Seite 336, Absatz 2 * --- -/-- | 11 | |
| Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt | | | |
| Recherchenort MÜNCHEN | | Abschlußdatum der Recherche 16. Januar 2001 | Prüfer Montrone, M |
| KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschrittliche Offenbarung P : Zwischenliteratur | | T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument | |

EPO FORM 1503 03.82 (P4/C03)



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 99 10 3135

| EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE | | | |
|---|---|---|--|
| Kategorie | Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile | Betrifft Anspruch | KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6) |
| X | PIRRUNG MICHAEL C ET AL: "A general method for the spatially defined immobilization of biomolecules on glass surfaces using "caged" biotin." BIOCONJUGATE CHEMISTRY, Bd. 7, Nr. 3, 1996, Seiten 317-321, XP002095758 ISSN: 1043-1802 * Zusammenfassung * * Seite 317, Spalte 1, Absatz 1 * * Seite 318; Abbildungen 1,2; Tabelle 1 * * Seite 319; Abbildungen 3,4 * * Seite 320, Spalte 2, Absätze 2-4 * --- | 8-11 | |
| X | HETLAND O ET AL: "Cardiac troponin T immunoassay on biotin-streptavidin-coated microplates: Preliminary performance in acute myocardial infarction." SCANDINAVIAN JOURNAL OF CLINICAL AND LABORATORY INVESTIGATION, Bd. 55, Nr. 8, 1995, Seiten 701-713, XP000945237 ISSN: 0036-5513 * Zusammenfassung * * Seite 702, Spalte 2, Absätze 1-5 * * Seite 704, Spalte 1, Absätze 1-3 * * Seite 709, Spalte 1, Absatz 1 * ----- | 11 | |
| Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt | | | RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6) |
| Recherchenort MÜNCHEN | | Abschlußdatum der Recherche 16. Januar 2001 | Prüfer Montrone, M |
| KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur | | T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument | |

EPO FORM 1503 03.82 (P04C03)



Europäisches
Patentamt

Nummer der Anmeldung

EP 99 10 3135

GEBÜHRENPFLICHTIGE PATENTANSPRÜCHE

Die vorliegende europäische Patentanmeldung enthielt bei ihrer Einreichung mehr als zehn Patentansprüche.

- ☐ Nur ein Teil der Anspruchsgebühren wurde innerhalb der vorgeschriebenen Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die ersten zehn sowie für jene Patentansprüche erstellt, für die Anspruchsgebühren entrichtet wurden, nämlich Patentansprüche:
- ☐ Keine der Anspruchsgebühren wurde innerhalb der vorgeschriebenen Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die ersten zehn Patentansprüche erstellt.

MANGELNDE EINHEITLICHKEIT DER ERFINDUNG

Nach Auffassung der Recherchenabteilung entspricht die vorliegende europäische Patentanmeldung nicht den Anforderungen an die Einheitlichkeit der Erfindung und enthält mehrere Erfindungen oder Gruppen von Erfindungen, nämlich:

Siehe Ergänzungsblatt B

- ☒ Alle weiteren Recherchegebühren wurden innerhalb der gesetzten Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.
- ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Recherchenabteilung nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
- ☐ Nur ein Teil der weiteren Recherchegebühren wurde innerhalb der gesetzten Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die Teile der Anmeldung erstellt, die sich auf Erfindungen beziehen, für die Recherchegebühren entrichtet worden sind, nämlich Patentansprüche:
- ☐ Keine der weiteren Recherchegebühren wurde innerhalb der gesetzten Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die Teile der Anmeldung erstellt, die sich auf die zuerst in den Patentansprüchen erwähnte Erfindung beziehen, nämlich Patentansprüche:



Europäisches
Patentamt

**MANGELNDE EINHEITLICHKEIT
DER ERFINDUNG
ERGÄNZUNGSBLATT B**

Nummer der Anmeldung
EP 99 10 3135

Nach Auffassung der Recherchenabteilung entspricht die vorliegende europäische Patentanmeldung nicht den Anforderungen an die Einheitlichkeit der Erfindung und enthält mehrere Erfindungen oder Gruppen von Erfindungen, nämlich:

1. Ansprüche: 1-7

Verfahren zum Aufbringen einer mehrlagigen Beschichtung in Form von räumlich begrenzten Flächen auf einen festen, nicht porösen Träger.

2. Ansprüche: 8-10

Verfahren zur Vermeidung des Verschmierens von räumlich begrenzt aufgetragenen Rezeptormolekülen auf einem festen Träger durch das nachträgliche Behandeln mit einer Nachbeladelösung.

3. Anspruch : 11

Verfahren zur Verringerung der unspezifischen Bindung an eine mit Streptavidin oder Avidin beschichtete Festphase.

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT
 ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 99 10 3135

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
 Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

16-01-2001

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|---|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| EP 0427984 A | 22-05-1991 | US 4496654 A | 29-01-1985 |
| | | AT 75051 T | 15-05-1992 |
| | | AT 121195 T | 15-04-1995 |
| | | AU 555790 B | 09-10-1986 |
| | | AU 3750585 A | 17-07-1986 |
| | | CA 1209035 A | 05-08-1986 |
| | | DE 3382545 D | 21-05-1992 |
| | | DE 3382785 D | 18-05-1995 |
| | | DE 3382785 T | 05-10-1995 |
| | | EP 0138826 A | 02-05-1985 |
| | | JP 4049657 B | 12-08-1992 |
| | | JP 60500731 T | 16-05-1985 |
| | | WO 8404171 A | 25-10-1984 |
| US 4591570 A | 27-05-1986 | AT 77699 T | 15-07-1992 |
| | | DE 3485785 A | 30-07-1992 |
| | | DE 3485785 T | 24-12-1992 |
| | | EP 0135541 A | 03-04-1985 |
| | | JP 60500732 T | 16-05-1985 |
| | | WO 8403151 A | 16-08-1984 |
| EP 0529775 A | 03-03-1993 | JP 5226637 A | 03-09-1993 |

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82